

城西大学水田記念図書館

0090009213

城西大学大学院薬学研究科
博士学位論文

VI

乙第1号

昭和62年度

城西大学水田記念図書館



VI

ヒトBリンパ球のIgE Fcレセプターと
IgE結合因子に関する研究

S. 62年 (1987)

0090009213

城西大学水田記念図書館

中島 敏治

ヒトBリンパ球の IgE Fc レセプターと IgE
結合因子に関する研究

中島 敏治

目 次

緒 論	1
第1章	モノクローナル抗体を用いたヒトBリンパ球の IgE Fc レセプターの構造解析	4
第2章	ヒトBリンパ球の IgE Fc レセプターと IgE 結合因子 との構造類似性の解析	35
総 括	51
謝 辞	53
文 献	54

[緒 論]

1966 年、石坂らによって発見された IgE 抗体が、アレルギー性疾患の病因として重要な役割を演じていることは、よく知られている (1, 2)。現在、これらの疾患 (枯草熱、アレルギー性鼻炎、アトピー性気管支喘息) の治療は、減感作療法を除いて、すべてが対症療法であり、さらに新しい免疫学的療法が必要とされている。そのためには、IgE 抗体産生調節機構の解析が不可欠である。例えば、非免疫原性のキャリアー (D-グルコサミンと D-リジンのポリマー) にハプテンを結合させ、この結合物をマウスに投与すると、B 細胞にトレランスが誘導され、抗ハプテン抗体産生が抑制されることを Katz ら (3) が報告した。この現象は、IgE 抗体のみならず、他のアイソタイプでも認められるので、ハプテン特異的な B 細胞の不活性化に起因するものと考えられている。一方、抗原特異的に IgE 抗体産生を抑制する試みもある (4)。すなわち、多量の尿素変性抗原をアジュバントなしでマウスに注射すると、抗原特異的サブプレサ T 細胞を誘導することができる。しかし、すでに IgE 抗体産生が持続期に入っている場合は、この変性抗原による抑制作用は認められない (5)。

近年、石坂ら (6) は、T リンパ球培養上清中に IgE 分子に親和性のある因子 (IgE binding factors, 以下 IgE-BFs) を見出し、これらの因子が他のクラスの免疫グロブリンの産生に影響せず、IgE 抗体を選択的、すなわちアイソタイプ特異的に調節することを報告した。同グループの Huff ら (7) は、寄生虫 *Nippostrongylus brasiliensis* 感染ラットの腸間膜リンパ節と胸腺腫細胞を細胞融合して、IgE 刺激によって IgE-BFs を産生するハイブリドーマを作製している。

IgE 抗体の Fc 部分に特異的に結合する IgE Fc レセプター (FcεR) は、その IgE に対するアフィニティーの強さと、抗原性の相違によって、2 種類に大別されている。高アフィニティー ($K_a = 10^9 \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$) FcεR は、好塩基球や肥満細胞上に存在し、細胞膜上の IgE と抗原 (アレルゲン) と

の作用によって、レアギン型反応(I 型 過敏症反応)を惹起することが知られている(8)。これに対して、低アフィニティー($K_a = 10^7 M^{-1}$) $Fc\epsilon R$ は、リンパ球、単球、マクロファージ、好酸球ならびに血小板の細胞膜上に存在している(9)。その生物学的機能については、寄生虫に対する IgE 抗体依存性の細胞障害にマクロファージや好酸球膜上の $Fc\epsilon R$ が関与することが報告されている(10)。興味あることに、IgE 抗体産生能の亢進したアレルギー患者、非アレルギー性高 IgE 血症である木村氏病患者や寄生虫感染症患者などにおいて、末梢血中の $Fc\epsilon R$ 陽性細胞が増加することが知られている(9, 11, 12)。Huff ら(13)は、ラット Tリンパ球由来の IgE-BFs に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製し、それらを用いた rosette assay により、IgE-BFs とリンパ球膜上の $Fc\epsilon R$ に共通した抗原決定基が存在することを報告した。これらの知見は、IgE 抗体産生の調節に、リンパ球の $Fc\epsilon R$ と IgE-BFs が関与していることを強く示唆している。

一方、この低アフィニティー $Fc\epsilon R$ の構造解析についての報告は少なく、分子量 45-50KD のタンパク質がその主構成成分として報告されている(14~17)。しかし、高アフィニティーの $Fc\epsilon R$ と比較して、IgE 分子に対するレセプターのアフィニティーの弱さが、この構造解析の大きな障害となっている。そこで、この $Fc\epsilon R$ の研究のためにはアフィニティーの高い特異抗体が必要になってくる。

1975年に Köhler と Milstein (18)によって開発された細胞融合法(ハイブリドーマ作製法)は、単一抗原決定基だけを認識する抗体、すなわちモノクローナル抗体を容易に、かつ大量に得ることを可能にした。現在では種々の細胞膜上の抗原やレセプター、さらには微量の生理活性物質に対するモノクローナル抗体が作製され、それによって多くの研究や臨床診断が行われている(19)。

我々は $Fc\epsilon R$ 陽性のヒト Bリンパ球細胞株である RPMI8866 細胞をマウスに免疫し、その脾細胞とマウス骨髓細胞株(NS-1)を細胞融合させて、 $Fc\epsilon R$ に特異的に反応する数種類のマウスモノクローナル抗体(以下 Mab ER)を作製した(20)。

本研究では、第1章において、低アフィニティー $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ に特異的かつ高い親和性を持つモノクローナル抗体を使用して、RPMI8866 細胞膜上の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の構造、およびその N-結合型糖鎖の有無、さらにそれら成分の共通抗原性やアミノ酸配列レベルにおける相同性などを検討した。第2章では、RPMI8866 細胞の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と同細胞由来の IgE-BFs の関係について、両者の抗原性やアミノ酸配列レベルでの相同性について追究した。

第1章

モノクローナル抗体を用いたヒトBリンパ球の
IgE Fc レセプターの構造解析

IgE 抗体は、分子量約 190KD の糖タンパク質で、抗原結合部位である Fab 部分と種々の生物活性に関与する Fc 部分から構成されている(21)。この IgE の Fc 部分に特異的に結合するレセプターが IgE Fc レセプター(以下 FcεR)で、IgE に対するそのアフィニティーや抗原性の相異によって2種類に大別されている。アフィニティーの高いレセプターは好塩基球や肥満細胞膜上に存在し、その平衡定数 (K_a) が $10^9 \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$ のオーダーであり、特異抗原とそれに対する IgE 抗体との相互作用によって、細胞内顆粒よりヒスタミン等の化学伝達物質を細胞外に遊離し、その結果アレルギー性鼻炎やアトピー性気管支喘息などのレアギン型反応 (I 型 過敏症反応) が惹起されることはよく知られている (8)。

この高アフィニティー FcεR の分子構造については、近年、Metzgerらのグループ(22)によって、 α 、 β および 2 つの γ -chain の4つのサブユニットからなるモデルが提唱された。すなわち、 α -chain は IgE と直接結合する細胞膜上に位置し、分子量 45KD の糖タンパク質であり、また β -chain (32KD) および γ -chain (9KD) は、糖鎖を持たないタンパク質で細胞膜内に存在し、さらに後者は、S-S 結合で2分子が結合した状態であることが報告されている。

一方、アフィニティーの低い FcεR は、リンパ球 (11, 12, 23, 24)、単球 (25, 26)、マクロファージ (27)、好酸球 (28) および血小板 (29) の細胞膜上に存在し、その平衡定数 (K_a) は 10^7 M^{-1} のオーダーであることが報告されている (9)。これらの FcεR は、IgE をコートした赤血球とのロゼット形成によって検出されているが、この FcεR 陽性細胞を trypsin 処理すると、そのロゼット形成が阻害されることから、このレセプターがタンパク質であることが強く示唆されている (23)。この FcεR の分子構造の解析は、ヒトでは B リンパ芽球やマクロファージなどの細胞株を、また齧歯動物では、ラットマクロファージやマウス B リンパ球などを対象に行われているが (14, 17)、これらの研究において、IgE 分子のレセプターに対するアフィニティーの弱さが、大きな障害となっている。しかし、この限られた条件下で、分子量 45-50KD の細胞膜上タンパク質が、ヒトやマウスの B リンパ球 (16, 17)、およびマクロファージ (15) の FcεR の主構成

分子として見出された。この 45-50KD 分子の他にリンパ球細胞株である RPMI8866 細胞と WIL-2WT 細胞より、86KD と 23KD の分子 (14, 16)が、またヒトマクロファージ様細胞株である U 937 細胞から 20-25KD の分子 (26)が、レセプターに関与したタンパク質として報告されている。

この低アフィニティー $Fc\epsilon R$ の生物学的機能は細胞の種類によって異なっている。たとえばマクロファージや好酸球膜上の $Fc\epsilon R$ は寄生虫に対する IgE 依存性細胞障害性に重要な役割を示している (10, 30)。またマクロファージからの slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) の放出の引金として、IgE 免疫複合体が関与することを示唆する報告もある (31, 32)。一方、リンパ球膜上の $Fc\epsilon R$ に関しては血中の IgE 産生レベルが高いアレルギー患者 (34)、非アレルギー性高 IgE 血症である木村氏病 (好酸球形肉芽腫) 患者 (11) や寄生虫感染症患者 (12) において、血中の $Fc\epsilon R$ 陽性細胞が増加することが知られている。また寄生虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*) 感染ラットで、リンパ節中の $Fc\epsilon R$ 陽性細胞の割合が上昇することが報告されている (35)。さらに、in vitro でも、ラットリンパ球を 1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の IgE 存在下で培養すると、 $Fc\epsilon R$ 陽性細胞が増加することが報告されている。したがって以上の報告は、 $Fc\epsilon R$ が IgE 抗体産生の調節に関与することを示唆したものであり、実際、動物モデルにおいて IgE に親和性のある可溶性因子 (IgE 結合因子) が $Fc\epsilon R$ 陽性リンパ球により産生され、クラス特異的に IgE 抗体産生を調節することが石坂らによって報告されている (6)。近年、Sarfati らにより、ヒト Bリンパ球培養上清中に同様な IgE 結合因子が存在し、その因子が in vitro の系で IgE 抗体産生を増強することが報告されている (35)。また、我々は、 $Fc\epsilon R$ 陽性ヒト Bリンパ球細胞株である RPMI8866 細胞でマウスを免疫し、その脾細胞とマウス骨髓腫細胞株 (NS-1) とを細胞融合した。得られたハイブリド-マの培養上清中の抗体を fluorescence activated cell sorter を用いて IgE をコートした蛍光ビーズと RPMI 8866 細胞とのロゼット形成阻害試験によりスクリーニングし、 $Fc\epsilon R$ と特異的に反応する数種類のマウスモノクローナル抗体 (以下 Mab ER と略す) を得た (20)。

本研究では、この Mab ER を用いて細胞膜上の FcεR の構造について immunosorbent や免疫沈降法を用いて解析し、さらに N-結合型糖鎖の有無についても検討した。次に、Western blot 法や peptide mapping により FcεR 成分の抗原性やアミノ酸配列レベルでの相同性について追究した。

[実験材料および方法]

試薬

以下の試薬を用いた。
carrier-free Na¹²⁵I (Amersham Co., Arlington Heights, IL), Sepharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden), Affi-Gel 10, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) standard (10,000-100,000 mol. wt., 40,000-250,000 mol. wt.), Coomassie blue R-250, Zeta-Probe blotting membranes, SDS, acrylamide, N,N'-methylene-bis-acrylamide, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), Bio-Lyte 3/5, Bio-Lyte 5/7, horseradish peroxidase (HRP)-color development試薬, HRP 結合ヒツジ抗マウス IgG (H+L) (以上 Bio-Rad, Richmond, CA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), benzamide hydrochloride, ε-amino caproic acid, iodoacetamide, ウシ血清アルブミン, 2-mercaptoethanol (2-ME), tunicamycin, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), α-chymotrypsin, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 3,3'-dithiobis (sulfo-succinimidyl propionate) (DTSSP), avidin-Sepharose (Pierce Chemical Co. Rockford, IL), Nonidet-P40 (NP-40) (Particle Data Laboratories Ltd., Elmhurst, IL), N-Glycanase (N-Glycosidase F) (Genzyme

Co. Boston, MA)。

培養細胞

RPMI8866 細胞 (23) は、Dr. P. Ralph (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NewYork, NY) より、また、RPMI8226 細胞は、 American type tissue culture collection (Rockvill, MD) より供与された。 Epstein-Barr ウイルスによってトランスフォームさせたヒトBリンパ球細胞株、HCは、我々の研究室で作製したものを使用した(36)。

以上の細胞株は、15% 牛胎児血清(FCS)、50 μ g/ml streptomycine, 50 IU/ml penicilinを含んだ RPMI1640 培養液を用いて CO₂ incubator (7% CO₂, 37°C) にて培養した。

また、RPMI8866 細胞の tunicamycin の存在下での培養は、95% エタノールに溶解した tunicamycin (1 mg/ml) を最終濃度 0.8 μ g/ml になるように培養液へ加え、 2×10^5 細胞/ml の細胞濃度で48時間行った。

抗体および immunosorbent カラム

ヒト IgE Fc レセプターに対するモノクローナル抗体 (Mab ER)は、我々の研究室で樹立したクローンより作製した(20)。すなわち Mab ER の精製は、ハイブリドマをマウス腹腔内で増殖させ、その腹水より、硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-Sephacyl)およびゲル濾過にて行った (Table 1)。

ヒト IgG は、健康人血清から、硫酸分画と陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製した。精製した抗体の純度は、Ouchterlony 法および SDS-PAGE にて検定した。

Table 1 Monoclonal antibodies to FcεR

Clone number	Isotype	Light chain
208.25 D 4.3 / 79 (3 / 79)	IgG1	Lambda
208.25 A 4.2 / 64 (64)	IgG1	Lambda
208.25 A 4.3 / 135 (135)	IgG1	Kappa
207.25 A 4.4 / 30 (30)	IgG1	Kappa
207.25 A 4.4 / 45 (45)	IgG2b	Kappa
208.25 B 1.5 / 14 (14)	IgG1	Kappa
208.25 A 4.2 / 79 (2 / 79)	IgG1	Lambda

ヒト IgE (PS) は、石坂公成博士 (Johns Hopkins University, Baltimore, MD) より供与された。

抗体のビオチン化は、0.5 M bicarbonate buffer (pH 8.4) で透析した抗体 (1 mg) に 60 μg の biotin-N-hydroxysuccinimide ester (B-NHS) を室温で4時間反応させ、未反応の B-NHS は Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) に透析して除去した。

immunosorbent カラムは、IgE または Mab ER を 4-6 mg/ml (packed gel) の濃度に調製し、BrCN で活性化した Sepharose CL-4B に結合させ作製した。また Affi-Gel 10 の場合も同じ濃度で作製した。

細胞表面の放射性ヨウ素標識と膜タンパク質の可溶化

細胞表面の膜タンパク質の標識に際しては、RPMI8866 細胞 ($2-3 \times 10^7$ 細胞) を 0.5 mCi の carrier-free ^{125}I を、lactoperoxidase 法 (37) を用いて標識し、氷冷した PBS で洗浄した。

この標識細胞を、lysis buffer で可溶化し、非可溶性物質を、4°C, 10,000 x g, 30分間の遠心操作で除去した。なお、lysis buffer は、0.5

% NP-40, 1 mM PMSF, 10mM benzamide hydrochloride, 50 mM ϵ -amino caproic acid および 20 mM iodoacetoamide を含むように調製した PBS である。

免疫沈降法、電気泳動、および autoradiography

免疫沈降反応は、基礎的検討（結果 Fig. 2, 3 参照）の結果より、80 μ l のヨウ素標識細胞可溶化上清に 2 μ g のモノクローナル抗体を加え、4°C で 30 分間のインキュベートした後、30 μ g のアフィニティ-精製したウサギ抗マウス IgG (γ 鎖特異性)抗体を加え、一晩反応させた。生成した抗原抗体複合体は、遠心 (10,000 \times g) により沈澱させ、wash buffer (0.5% NP-40, 0.05% BSA, 1 mM PMSF を含んだ PBS) で洗浄後、Laemmli (38) の sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (以下 SDS-PAGE) の sample buffer (2-ME の存在下または非存在下)を加え、加熱処理し、SDS-PAGE を行った。

すなわち、10% または 15% の slab gel (厚さ 1.5 mm) を使用した。泳動後、gel を 0.25% (w/v) coomassie brilliant blue R-250 で染色し、過剰の色素を脱色後、減圧下で加熱乾燥した。autoradiography は lightening/intensifying screen を用いて -70°C で XAR-5 X-ray film (Eastman Kodak, Rochester, NY) を感光させて行った。

Immunosorbent による実験

200 μ l の放射性ヨウ素標識可溶化上清に、30 μ l の immunosorbent を加え、4°C で一晩インキュベートした。反応後、immunosorbent を wash buffer (0.05% BSA, 0.5% NP-40, 1mM PMSFを含むPBS)で洗浄し、Laemmli の SDS-PAGE の sample buffer (2% SDSを含む0.0625 M Tris-Cl, pH 6.8)を加え、100°C で2分間加熱処理して結合した成分を溶出し、SDS-PAGE を行った。

阻害剤を用いた実験系では、IgE, Mab ER, または、コントロール Mab

を含んだ PBS と、標識細胞可溶化上清を 4°C で 1 時間インキュベートした後、immunosorbent を加え、同様に行った。

化学的架橋剤を用いた FcεR の検討

¹²⁵I で標識した RPMI8866 細胞を 0.1% の HEPES を含む Hank's balanced salt solution (以下 HBSS と略す) で 2 回洗浄し、種々のビオチン化した抗体を含む 150 μl の HBSS に浮遊させ、4°C で 90 分間インキュベートした。さらに、この細胞を 1 mM の 3,3'-dithiobis (sulfo-succinimidyl propionate) (DTSSP) を含む HBSS に再浮遊させ、氷中で 30 分間反応させてレセプターとリガンドを化学的に架橋させた(39)。反応後、10% FCS を含む HBSS および HBSS で洗浄後、300 μl の lysis buffer で可溶化し、この遠心上清を avidin-Sepharose とインキュベートして、ビオチン化した抗体と反応したタンパク質を吸着させた。この avidin-Sepharose に結合したタンパク質を 5% 2-ME を含む sample buffer で溶出させ、SDS-PAGE で検討した。

Mab ER の結合阻害を検討した実験系では、標識細胞を種々の非ビオチン化抗体とインキュベートし、上記の条件で DTSSP を用いて化学的に架橋させた。洗浄後、ビオチン化した Mab ER と反応させ、上記と同様に avidin-Sepharose を加え、結合したタンパク質を SDS-PAGE で検討した。

2 次元電気泳動法

2 次元電気泳動は、O'Farrel の方法(40)に準じて行った。すなわち、1 次元目の等電点電気泳動は、2% NP-40, 8.5 M 尿素, 1% bio-lyte 3/5, 1% bio-lyte 5/7 を含んだ 4% ポリアクリルアミドゲル (2.5 x 125 mm) を使用し、2 次元目は還元下で、SDS-PAGE (10% slab gel) を用いて行った。

Western blot 法

可溶化した非標識細胞 (RPMI8866, RPMI8226, HC) の遠心上清を SDS-PAGE を用いて 2-ME の非存在下で泳動し、この slab gel 上に展開したタンパク質を電氣的に、Zeta-probe 膜に転移させた (定電圧 70V, 2.5 時間)。さらに、この Zeta-probe 膜を 10% FCS および 0.1% NaN を含む Tris buffered saline (20 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, pH 7.5, 以下 TBS と略す) とインキュベートして非特異結合部位をブロックした。次にモノクローナル抗体 (10-15 $\mu\text{g/ml}$) と 1% BSA を含む TBS と 5 時間反応させ、洗浄後、さらに horseradish peroxidase 結合ヒツジ抗マウス IgG と一晩反応させた。抗体と反応したタンパク質は、horseradish peroxidase の発色基質である 4-chloro-1-naphthol を反応させて可視的に検出した。

N-Glycanase 処理による糖鎖の検討

放射性ヨウ素で標識した RPMI8866 細胞の可溶化上清を、Mab ER を結合した Affi-Gel と一晩インキュベートし、wash buffer で洗浄後、カラムに結合したタンパク質を、0.5% SDS および 0.1 M 2-ME を加えて 3 分間加熱処理して、溶出させた。この溶出液に、phosphate buffer (pH 8.6, 最終濃度, 0.2 M; 以下同様)、EDTA (50 mM), NP-40 (1.25%) および N-Glycanase (10 units/ml) を加えて、30°C で一晩酵素処理した (41, 42)。

peptide mapping

RPMI8866 細胞を放射性ヨウ素で細胞表面標識し、lysis buffer で可溶化した遠心上清に Mab ER の immunosorbent を加え、一晩インキュベートした。immunosorbent を洗浄後、最初 0.5% NP-40 を含んだ 0.2 M glycine-HCl, pH 2.3 で溶出し、溶出液を直ちに 2 M Tris で中和し、0.5% NP-40 を含んだ PBS で透析した。さらに、この immunosorbent を

0.5% NP-40 を含んだ 3.5 M KSCN で溶出し、同様に透析した。溶出したこれらの画分を、濃縮後 SDS-PAGE で泳動した。泳動後、この slab gel を横に 4 mm 幅に切断し、それぞれの放射能活性を測定して 35KD, 45KD, および 65-95KD (85KD 付近) に対応する切片について、Cleveland の方法(43)に従って peptide mapping を行った。すなわち、この切片を equilibration buffer で平衡化した後、SDS-PAGE(15%) の sample well にセットし、その上に 50 μ l の α -chymotrypsin 溶液(2, 20 および 200 μ g/ml)を重層して泳動した。

[結 果]

IgE および Mab ER と結合する RPMI8866 細胞膜上成分の検討

^{125}I で標識したRPMI8866細胞を、種々のプロテアーゼ阻害剤の存在下で、非イオン型界面活性剤 (Nonidet P-40) により可溶化し、その遠心上清に IgE-Sepharose を加えて、インキュベートした。また、結合特異性の検討には、種々の可溶性免疫グロブリン [IgE (600 $\mu\text{g/ml}$), Mab ER (500 $\mu\text{g/ml}$), コントロール Mab (500 $\mu\text{g/ml}$, この Mab は Mab ER と同じサブクラス)] を可溶化上清と反応させた後、immunosorbent を加えた。この immunosorbent に結合した成分を SDS-PAGE の sample buffer で加熱溶出し、非還元下のSDS-PAGEで検討した。Mab ER-Sepharose に吸着した分画には、autoradiography で65-95KD, 43KD, および 31KD のバンドが検出された (Fig. 1E)、さらに、可溶性 Mab ER により完全に阻害され (G)、IgE では部分的に阻害された (F)。しかし、コントロール Mab では、影響が認められなかった (H)。

一方、IgE-Sepharose に吸着した分画には、43KD のバンドが検出され (A)、また一部の実験では、65-95KD のバンドが見られた。この 43KD 成分は、IgE (B) および Mab ER (C) によって、IgE-Sepharose への結合が完全に阻害されたが、コントロールの Mab では変化が見られなかった (D)。次に、免疫沈降法により Mab ER で沈降する抗原を検出するために、まず抗体量に関する基礎的検討を行った。非標識 Mab ER に微量の ^{125}I 標識 Mab ER を加え、これと種々の量のアフィニティー精製したウサギ抗マウス IgG 抗体 (第 2 抗体) をインキュベートした後、遠心沈渣の放射能活性を測定した。Fig. 2 に示すように、20~32 μg の第 2 抗体 (ウサギ抗マウス IgG 抗体) が、2 μg の Mab ER を沈澱させるための最適であった。

さらに、抗原 (標識細胞可溶化上清中の Fc ϵ R) と第 1 抗原 (Mab ER) の最適比を求めるために、一定量 (80 μl) の標識細胞可溶化上清に、種々の量の第 1 および第 2 抗体を反応させ、免疫沈降させた (Fig. 3)。この

結果より、80 μ l の可溶化上清中の抗原(Fc ϵ R)を沈澱させるには、約 2 μ g 以上の Mab ER が必要であった。これらの結果より、以下の実験では、第 1 抗体として 2 μ g の Mab ER を第 2 抗体として 30 μ g のウサギ抗マウス IgG 抗体をそれぞれ用いて、免疫沈降法を行った。

Mab ER が認識する RPMI8866 細胞上の成分を、上記の方法で沈澱させ、2-ME の非存在下および存在下で SDS-PAGE を行ったところ、非還元下では、Mab ER の immunosorbent を用いた実験結果と同様に、65-95KD, 43KD, 31KD のバンドが検出された(Fig. 4A)。また、還元下でも、ほぼ同様の

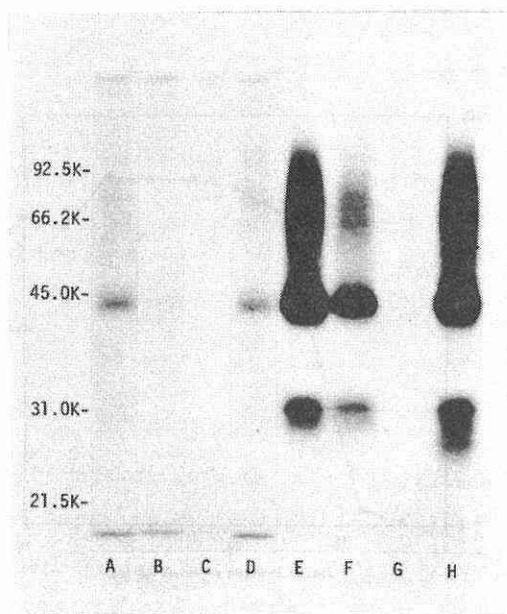


Figure 1.

Autoradiograph of the 10% SDS-PAGE (under nonreducing conditions) of material from radiolabeled cell lysate of RPMI 8866 cells bound to IgE-Sepharose (A to D) and to Mab ER-Sepharose (E to H), in the absence of inhibitors (A and E) or in the presence of IgE (B and F), Mab ER (C and G) or unrelated Mab (D and H).

パターンが観察された。しかし、31KD と 43KD のバンドは、それぞれ37 KD, 45KD にシフトした(B)。さらに、この還元剤による分子量の変動を検討した。すなわち、FcεR の免疫沈降複合体を非還元下の SDS-PAGE で泳動し、この slab gel を4 mm の幅の切片に切断した後、それぞれの

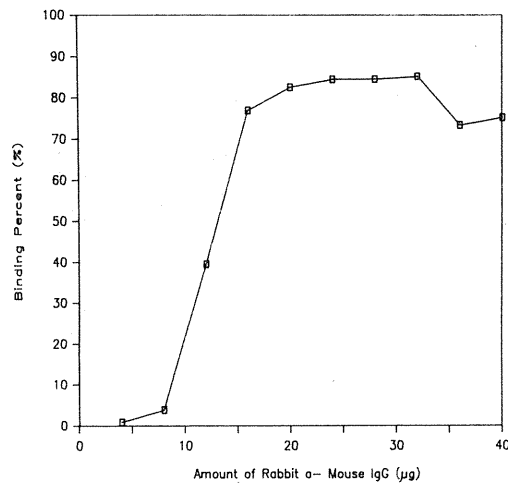


Figure 2.

Titration of rabbit anti-mouse IgG for the immunoprecipitation of Mab ER. Radioiodinated Mab ER (2 μg) were incubated with different amounts of affinity purified rabbit anti-mouse IgG antibody for 30 min at room temperature. After washing the precipitate, the radioactivity was measured by a gamma-counter.

放射能活性を測定した。この分子量 31KD および 43KD に対応する切片を、還元下の SDS-PAGE で再び泳動した。この結果、31KD と 43KD 成分がそれぞれ 37KD と 45KD にシフトすることが確認された。

Mab ER-Sepharose に結合した抗体を、SDS-PAGE の sample buffer の代わりに、glycine-HCl buffer (pH 2.3) を用いて溶出したところ、37KD

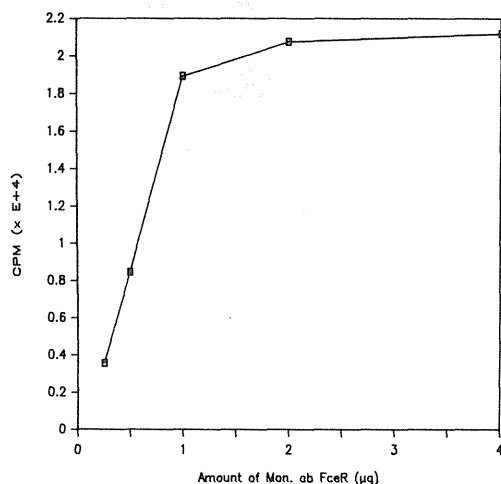


Figure 3.

Immunoprecipitation of FcεR in RPMI 8866 cell lysate by different amounts of Mab ER. Eighty μl of radiolabeled RPMI 8866 cell lysate was supplemented with different amounts of Mab ER. After 30 min incubation, the mixture was precipitated with rabbit anti-mouse IgG antibody.

と 45KD の成分のみが溶出された (Fig. 5B)。続いて 3.5 M KSCN で溶出すると、65-95KD 成分が検出された (A)。この結果は、65-95KD 成分が 37KD と 45KD 成分より、Mab ER に強いアフィニティを持つか、あるいは Sepharose に吸着されやすい物質である可能性を示唆している。

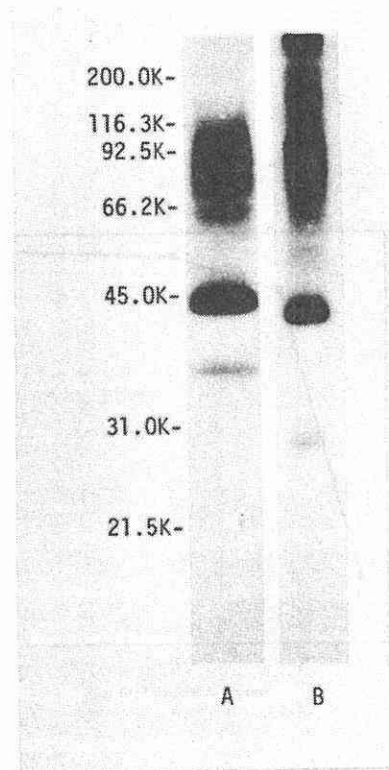


Figure 4.

Autoradiograph of the 10% SDS-PAGE analysis of immunoprecipitate formed with radiolabeled cell lysate of RPMI 8866 cells and Mab ER under reducing (A) or non-reducing conditions (B).

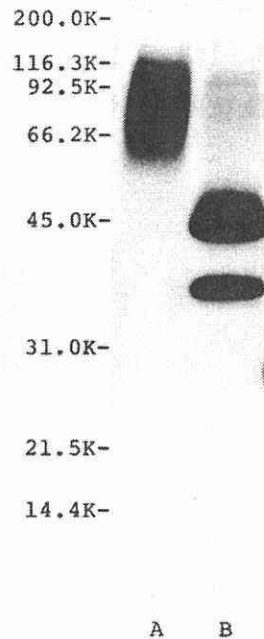


Figure 5.

Autoradiograph of 10% SDS-PAGE (under reducing conditions) of affinity purified $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ from RPMI 8866 cells. Lane B shows the material eluted from Mab ER immunosorbent by means of 0.2 M glycine-HCl, pH 2.3. Lane A shows the material subsequently eluted from the same immunosorbent by means of 3.5 M KSCN.

化学架橋剤 DTSSP を用いた $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の構造の検討

リガンド (IgE) と可溶化していない標識細胞上のレセプター-を両側反応性の化学架橋剤 (DTSSP) を用いて化学結合させ、 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ を単離し、その構造を検討した。

放射性ヨウ素 (^{125}I) で標識した RPMI8866 細胞を、ビオチン化 IgG (以下 B-IgG), B-Mab ER, または HBSS と 4°C で 90 分間インキュベートし、遠心後、その細胞沈渣に 1mM の DTSSP を加え、氷冷下で 30 分間反応させた。洗浄後、この細胞を可溶化し、その遠心上清に avidin-Sepharose

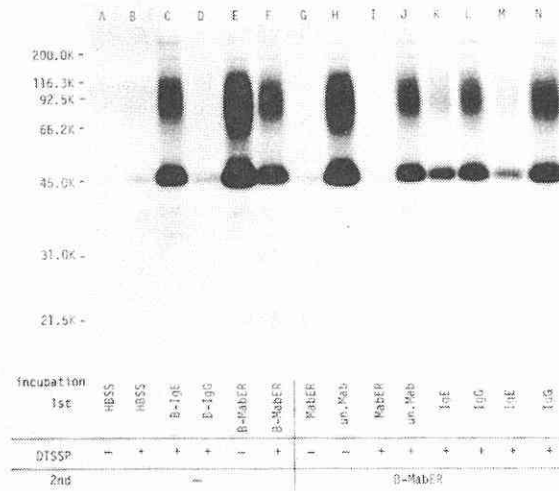


Figure 6.

Autoradiograph of the 10% SDS-PAGE (under reducing conditions) of reduced material adsorbed to avidin-Sepharose from RPMI 8866 cells to which B-IgE (C), B-IgG (D), were cross-linked prior to solubilization. Lane (A) shows control cells and (B) control cells treated by the cross-linking reagent (DTSSP) without ligand. (E and F) were obtained by reacting the cells with B-Mab ER without (E) or with (F) cross-linking, in (G and I), the binding of B-Mab ER was inhibited by unconjugated Mab ER, in (H and J), the binding of B-Mab ER was not disturbed by unconjugated unrelated Mab. The binding of B-Mab ER to intact cells was inhibited by soluble IgE (K and M) but not by IgG (L and N).

を加え、さらに、ビオチン化した免疫グロブリンとそれに結合した成分との複合体を吸着させ、2-MEの存在下で SDS-PAGE を行った。

Fig. 6 に示すように、DTSSP で B-IgE と結合したタンパク質(C)は B-Mab ER と結合したものと同一泳動パターンを示し、その分子量は 65-95KD, 45KD および 37KD であった。E は B-Mab ER を DTSSP の非存在下で反応させたもので、上記の F と同じパターンを示した。一方、B-IgG では、薄い 45KD のバンドが検出されたが、これはコントロールのHBSS (A, B)と同程度の非特異的なもので、IgG に特異的に結合するタンパク質は検出されなかった。さらに、レセプターへの B-Mab ER の結合が、これら免疫グロブリンによってどの程度阻害されるかを検討した。すなわち、細胞表面を放射性ヨウ素標識した細胞を、ビオチン化していない免疫グロブリン (IgE, IgG, Mab ER, または コントロール Mab)とインキュベートし、遠心後 DTSSP で架橋させ、さらに B-Mab ER と反応させた。B-Mab ER と結合したレセプターは、上記と同様に SDS-PAGE で検討した。この結果、化学的に架橋させた IgE は、B-Mab ER のレセプターへの結合をその濃度に比例して (K : IgE 15 μ g, M : 75 μ g)阻害したが、同じ濃度の IgG では影響が見られなかった(L, N)。一方、5 μ gの MabER はレセプターへの結合を完全に阻害したが、コントロール Mab では影響が認められなかった。

2次元電気泳動

Mab ER が認識する RPMI8866 細胞上の Fc ϵ R を O'Farrel の 2次元電気泳動で検討した。すなわち、1次元目にアンホラインを用いて等電点電気泳動を行い、2次元目に SDS-PAGE を行った。その結果、Fig. 7 に示す様に、65-95KD 分子の等電点は pI 4.2-4.4 で酸性のタンパク質であった。また、45KD および 37KD 分子の pI は5.1-5.2 であった。

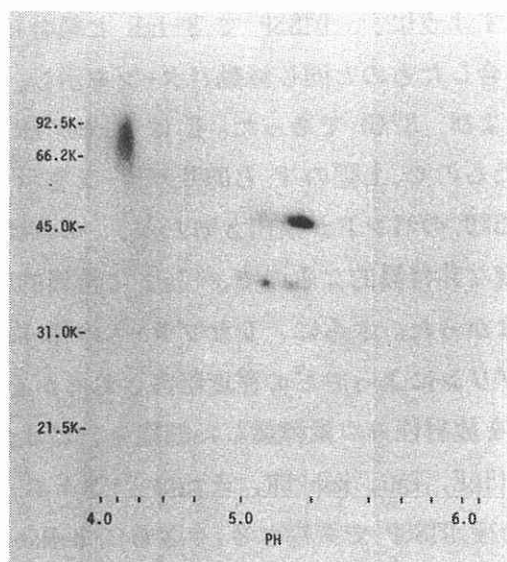


Figure 7.

Two-dimensional gel analysis of $Fc\epsilon R$. Isoelectric focusing followed by SDS-PAGE analysis of the binding material to Mab ER from solubilized RPMI 8866 cells.

Western blot 法による抗原性の検討

$Fc\epsilon R$ の構成成分として検出された3種類のバンドの抗原性を、Western blot 法によって検討した。非標識細胞可溶化上清の SDS-PAGE を行い、展開したタンパク質を Zeta-Probe 膜に電氣的に転移させ、その膜上のタンパク質と Mab ER をインキュベートし、MabER と反応したバンドを酵素反応を利用して検出した。

Fig. 8 は、RPMI8866 細胞(A, B) および $Fc\epsilon R$ 陰性細胞である RPMI

8226 (C, D) の可溶化上清を非還元下で泳動後、Mab ER (A, C) およびコントロール Mab (B, D) を反応させた成績であり、RPMI8866 細胞に Mab ER を反応させた A の場合にのみ 65-95KD と 43KD のバンドが検出された。

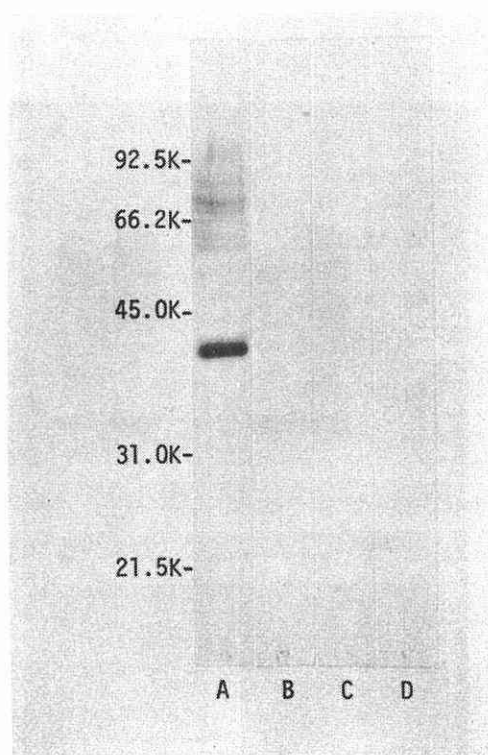


Figure 8.

Western blot analysis of the antigens binding to Mab ER 135. (A and B) correspond to RPMI8866 cells and (C and D) to RPMI8226 cells; (A and C) were obtained with Mab ER 135 and (B and D) with unrelated Mab.

Fig. 9 は、RPMI8866 細胞、RPMI8226 細胞および Epstein-Barr ウィルスで形質転換させたヒト B リンパ球株 (HC) の可溶化上清に、別の2種類の Mab ER (A-C; 64, D-F; 4.2/79) で反応させた成績である。RPMI 8866 細胞 (A, D) と HC (B, E) には、同じ2種類のバンド (65-95KD, 43KD) が認められたが、RPMI8226 細胞では、検出されなかった。さらに、RPMI 8866 細胞を用いて他の6種類の Mab ER で検討した結果、上記と同様2種類のバンドのみが認められたが、31KD のバンドは検出されなかった。

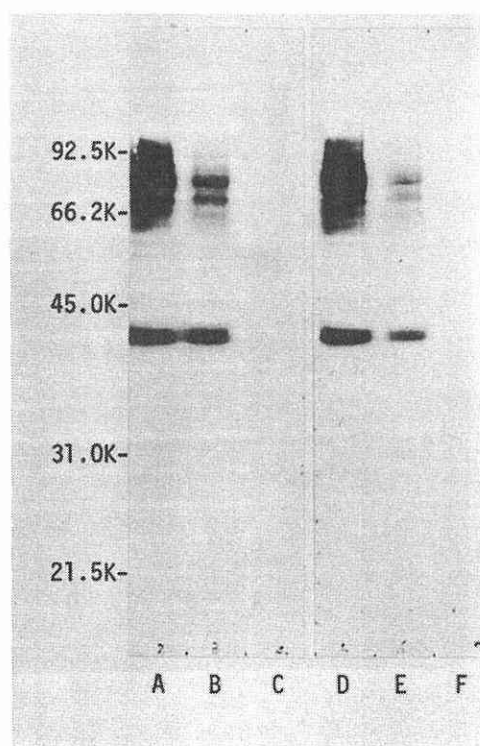


Figure 9.

Western blot analysis of the antigens from RPMI 8866 cells (A and D) and HC cells (B and E) reacting with Mab ER 64 and Mab ER 4.2/79 (C and F) correspond to RPMI 8226 cells.

実際、31KD のバンドが Zeta-Probe 膜に転写されているかどうかを確認するために、RPMI8866 細胞の¹²⁵I 標識可溶化上清から immunosorbent によりアフィニティ-精製した FcεR を用いて、同様に Western blot法を行った。その結果、その autoradiography より FcεR の3成分が転写されていることが確認された。

N-Glycanase および tunicamycin による N-結合型糖鎖の検討

FcεR の N-結合型糖鎖を検討するために、N-Glycanase による酵素処理を行った。すなわち、標識した RPMI 8866 細胞の可溶化上清から immunosorbent を用いて FcεR を精製し、これを N-Glycanase で処理して N-結合型の糖鎖の除去を試みた。その結果、3成分中 45KD のバンドが 43KD にシフトした。しかし、他の 65-95KD および 37KD 成分には分子量の大きな変動が認められなかった (Fig. 10)。

次に、N-結合型糖鎖の合成阻害剤である tunicamycin で細胞を処理して、その FcεR を検討した。すなわち、RPMI8866 細胞を tunicamycin 存在下で 48 時間培養した後、¹²⁵I で細胞表面を標識し、可溶化した上清中

の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ を免疫沈降法で沈澱させ SDS-PAGE (還元下) で解析した。その結果 (Fig. 11)、未処理の RPMI 8866 細胞 (B) と比較して、tunicamycin 処理した細胞 (C) では 43KD のバンドおよび薄い 37KD のバンドが検出され、65-95KD のバンドは検出されなかった。また、薄い 45KD のバンドが検出されたが、同様なバンドがコントロール Mab で免疫沈降させたもの (D) でも観察された。

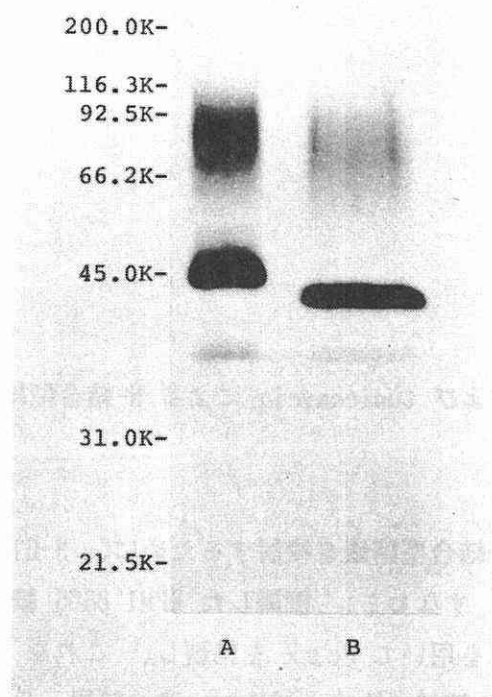


Figure 10.

N-Glycanase treatment of affinity purified $\text{Fc}\epsilon\text{R}$.

SDS-PAGE (10%) analysis of affinity purified $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ (A) from surface labeled RPMI 8866 cells, and those treated with N-Glycanase (B).

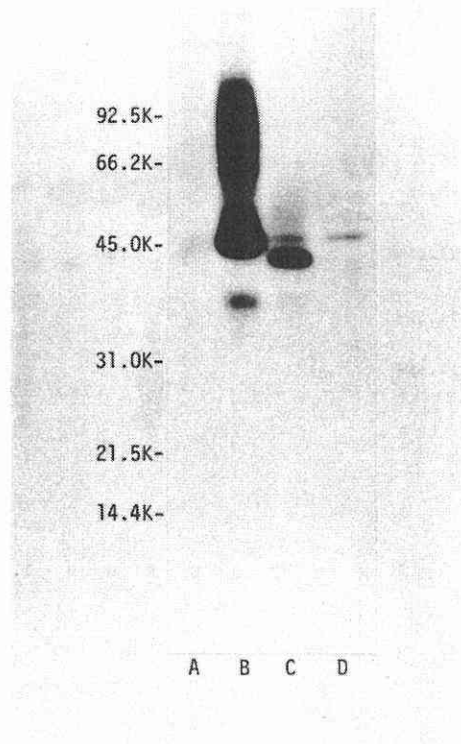


Figure 11.

SDS-PAGE analysis of FcεR from tunicamycin treated RPMI8866 cells.

Immunoprecipitation of radioiodinated and solubilized RPMI8866 cells treated (Lanes C and D) or untreated (Lanes A and B) with tunicamycin; Lanes A and D: immunoprecipitation by unrelated Mab ; Lanes B and C : precipitation by Mab ER.

Peptide mapping

Mab ER で確認された3種類の成分 (65-95KD, 45KD, 37KD)のアミノ酸配列の相同性を検討するために、α-chymotrypsin を用いてpeptide mapping を行った。Fig. 12 の A, B, C は、無処理の 65-95KD, 45KD, 37

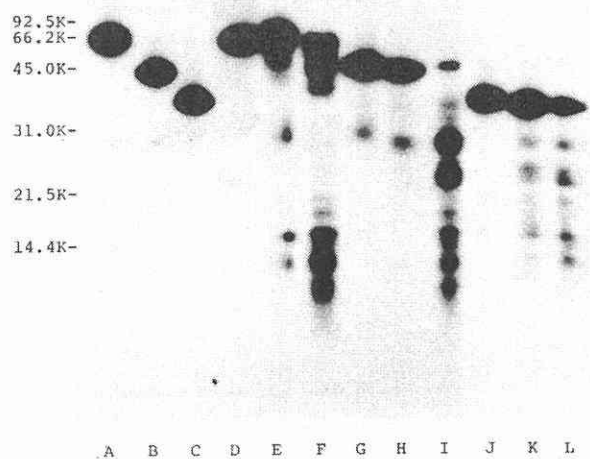


Figure 12.

Peptide mapping of the 3 components of Fc ϵ R

The 3 components of Fc ϵ R were first isolated by fractionation on SDS-PAGE ; Lanes A to C show the purified components. These were individually digested with α -chymotrypsin and the peptides were analyzed on a 15% SDS-PAGE under reducing condition. Lanes D to F correspond to high mol. wt. components treated with 2 μ g/ml (Lane D), 20 μ g/ml (Lane E) and 200 μ g/ml (Lane F) of α -chymotrypsin ; Lanes G to I correspond to the 45 KD component treated with 2 μ g/ml (Lane G), 20 μ g/ml (Lane G) and 200 μ g/ml (Lane I) ; Lanes J to L correspond to the 37 KD component treated with 2 μ g/ml (Lane J), 20 μ g/ml (Lane H) and 200 μ g/ml (Lane L).

KD であり、また E~M は $2\mu\text{g/ml}$ (E, H, K), $20\mu\text{g/ml}$ (F, I, L) および $200\mu\text{g/ml}$ (G, J, M) の α -chymotrypsin を用いて 65-95KD (E~G), 45KD (H~J), および 37KD (K~M) の成分を SDS-PAGE で泳動中に酵素処理をしたものである。これら 3 成分の peptide mapping のパターンは、極めて類似していた。

[考 察]

本研究に用いたヒトBリンパ球上の $Fc\epsilon R$ に対するモノクローナル抗体の作製方法および性状については、すでに我々のグループより報告されているが、この Mab ER の特異性に関しては、下記の3点によって証明した(20)。

(I) この Mab ER およびその $F(ab')^2$ fragment が、数種類の $Fc\epsilon R$ 陽性細胞株への IgE の結合を阻害する。(II) この Mab ER は $Fc\epsilon R$ 陽性細胞に結合するが、 $Fc\epsilon R$ 陰性細胞には結合しない。さらに、その結合が IgE 抗体によってのみ阻害され、他のクラスの免疫グロブリンでは影響されない。(III) この Mab RE は $Fc\gamma$ レセプター-陽性細胞への IgG の結合には影響を与えない。さらに、この Mab ER が認識する $Fc\epsilon R$ 陽性細胞膜上の抗原と、IgE に結合する成分が同一物質であることにより、この Mab ER が IgE Fc レセプター-を認識していることを証明した。実際、 $Fc\epsilon R$ 陽性細胞株である RPMI8866 細胞を細胞標識後可溶化し、その上清中の Mab ER と結合するタンパク質を Mab ER-immunosorbent で吸収して SDS-PAGE で検討すると、65-95KD, 45KD, 37KD の3種類の成分が検出された。また、この Mab ER による免疫沈降法でも、同一の結果が得られた。一方、IgE を用いた場合、すなわち、標識細胞の可溶化上清を IgE-immunosorbent で吸収し、同様に検討したところ、主として 45 KD バンドが観察され、しばしば65-95KD バンドが、そして一部の実験においてのみ 37KD バンドが検出された。この IgE-immunosorbent を用いた結果は、Spiegelberg ら(14)や、Conrad ら(44)の報告とほぼ一致した。これら Mab ER と IgE の immunosorbent の実験結果を比較すると、前者では非常によい再現性が得られた。また、同量の標識細胞可溶化上清を同容量のこれらの immunosorbent で吸収した場合、IgE に結合した放射活性は、Mab ER のそれと比較し極く軽度であった。これらの結果は、IgE レセプター-に対する IgE 分子のアフィニティ-の弱さによってよく説明できる。さらに、これらの immunosorbent からの溶出した成分を SDS-

PAGE で泳動後、その autoradiography のバンドを gel scanner で測定したところ、IgEおよび Mab ER に結合した各バンド(65-95KD, 45KD) の濃度の比は、類似していた(未発表)。

このようなアフィニティの低い($K_a = 10^7 \text{ M}^{-1}$)レセプターの構造を解析する場合、レセプター-トリガンドを人工的に共有結合を介して架橋することにより、分析する方法がある。この目的のために、光反応性のリガンドによる方法(45)と、化学架橋剤による方法(46)が開発された。前者は、リガンドの一部に光によって活性化される反応基を導入し、光反応によって近傍のタンパク質との間に共有結合を作らせる方法であり、反応基の導入が面倒である半面、特異的な反応が認められる利点がある。一方、後者は両側反応性試薬であり、片側がレセプター、また、もう一方がリガンドの遊離アミノ基と反応して、両者間に共有結合を作る方法である。本研究に用いた DTSSP (39)はさらに分子の中心に S-S 結合をもつので、架橋反応後、還元剤(2-ME)の作用で容易にレセプター-トリガンドを分離することができる特徴を持っている。実際、Mab ER と同じ3種のバンドがこの試薬を用いることによって IgE と結合していることが明らかになった。また、幅広い 65-95KD の成分が、8.5 M の尿素および 5% 2-ME 処理でも、その分子量が変動しないことから、この分子が 45KD の凝集物や、ダイマーでないことを示している。

糖タンパク質の N-結合型糖鎖の合成阻害剤である tunicamycin(47)で処理した RPMI8866細胞を用いた実験より、45KD および 65-95KD のバンドが N-結合型の糖鎖を持つタンパク質であることが示された。しかし、N-Glycanase 処理では、45KD の成分のみが 43KDにシフトし、65-95KD 成分には大きな変動は認められなかった。この実験結果は、N-Glycanase、すなわち peptide-aspartylglycosylamine aminohydrolase の基質特異性のために 65-95KD バンドに作用しないか、またはこの成分が糖を介してリン脂質などの他の物質が結合しているために、この酵素作用を受けにくいことを示唆しているが、この問題点についてはさらに検討が必要である。

O'Farrel の2次元電気泳動法を用いて、Mab ER の認識する FcεR の

3成分を泳動したところ、65-95KD 成分は、pI 4.2~4.4 で酸性の等電点を示した。一方、45KD と 37KD の成分は、pI 5.1~5.2であった。近年、Conrad ら(16)により、この 45KD の等電点は IgE をリガンドとして精製されたレセプター (46KD) の等電点 (pI 4.5~5.0)に近い値であることが示された。

さらに、これらの FcεR の3成分の共通抗原性をWestern blot法により検討した。その結果、興味あることに、65-95KDと 45KD のバンドにのみ8種類の Mab ER が反応した。これは、この2つの構成成分が共通抗原基を持ち、少なくとも、1つ以上の共通したペプチドを持つことを示している。また、2-ME 存在下の SDS-PAGE では、いずれのバンドも検出されなかった。これは、この抗原決定基が、分子内 S-S 結合によって形成される立体構造部位、またはそれに非常に近い部位にあることを示唆している。また、37KD の成分は、Western blot法で検出されなかったが、実際にその分子が Zeta-Probe 膜に転移されているか否かを放射性標識した FcεR を用いて検討したところ、autoradiography によりその転移が確認された。しかしながら、この37KD 成分上の Mab ER によって認識される抗原決定基の有無については、その抗原量や酵素反応による検出法の感度などに限界があるので、さらに検討が必要である。

これらの Mab ER が認識した 3種類のバンドのアミノ酸配列レベルでの相同性を α-chymotrypsin による peptide mapping によって検討したところ、これら3種類のバンドは幾つかの共通したペプチドで構成されていた。特に、45KD と 37KD 成分には多くの共通したペプチドが認められた。また、protease V8 による peptide mapping でも、多数の共通したポリペプチドが確認された(未発表)。Peterson と Conrad (44)は、RPMI8866 細胞より IgE をリガンドとした immunosorbent を用いて、83KD, 46KD, 25KD および 16KD の分子を検出している。さらに、SDS-PAGE で分画した 46KD と 83KD の成分を、それぞれ trypsin で分解し、HPLC 逆相クロマトグラフィーで分画した。その結果、その溶出パターンが類似していたので、この2つの成分が同一のペプチドから構成されていることを報告した。これは、本研究の α-chymotrypsin の

peptide mapping および Western blot 法の結果とよく一致している。

近年、末村らは、我々と同様にRPMI8866細胞をマウスに免疫し、FcεRに特異的の3種類のモノクローナル抗体を作製し、同細胞膜上のFcεRをこのモノクローナル抗体を使用して検討したところ、60-90KDのスメイヤーバンド、46KD および 25-30KD の成分を検出し報告している(11, 47)。また、淀井らのグループはFcεR 陽性細胞株 RPMI1788 細胞を用いて同様にマウスモノクローナル抗体を作製し、このモノクローナル抗体(H107)が認識する抗原(FcεR)として45KDの分子を見出した(48)。これら2つのグループの報告は、本研究の結果とよく一致している。さらに、我々のグループのLudinらは、RPMI8866細胞からFcεRをコードしたcDNAをクローニングし、その遺伝子をchinese hamster ovary (COS)細胞に導入させ、IgEと結合能力のあるFcεRの発現させることに成功した(50)。このcDNAの全塩基配列より、FcεRは321個のアミノ酸で構成され(分子量36281D)、N-結合型糖鎖を一つ持つ膜タンパク質であることが示された。また、このFcεRは通常の膜タンパク質と異なり、N末端を細胞質内、C末端を細胞外に表現していた。一般に、アセチルコリンレセプター-(51)、インスリンレセプター-(52)、低比重リポタンパク質レセプター-(53)などの多くのレセプターはN末端を細胞外、C末端を細胞内に表現している。これに対して、このFcεRは反対のオリエンテーション、すなわちN末端を細胞内、C末端を細胞外に表現していた。同様の構造はトランスフェリンレセプター-(54)、アシアロ糖タンパク質レセプター-(55)、組織適合性クラスII抗原のγ-chainにも認められている。興味あることに、このFcεRのC末端側において、アシアロ糖タンパク質レセプターとアミノ酸配列に高い相同性が認められた。

以上の成績から、Mab ERが認識したRPMI8866細胞膜上のFcεRの性状を総括すると、45KD分子はFcεRの主構成成分であり、N-結合型の糖鎖を持ったタンパク質であるが、37KD分子はN-結合型の糖鎖を持たないタンパク質であり、45KD分子の分解産物であると思われる。一方、65-95KDの幅広い分子量を持つバンドは45KD分子と同じポリペプチドと、N-結合型の糖鎖を持ったタンパク質であり、さらにこれは45KD

分子のダイマーでなく、ペプチド以外の物質(例えば、脂質または O-結合型糖鎖)の結合した物質であると思われる。しかし、この点に関しては、さらに詳細な解析が必要である。

第2章

ヒトBリンパ球の IgE Fc レセプターと IgE 結合因子
との構造類似性の解析

ヒトやマウスにおいて、IgE 抗体産生を特異的に調節する因子が存在することが知られている。これらの調節因子のうち、IgE 分子にアフィニティを持つものはIgE 結合因子(IgE binding factors, 以下 IgE-BFs と略す)と呼ばれている(56)。そして、これらの因子は、FcεR 陽性細胞と IgE をコートしたウシ赤血球との間の rosette 形成を阻止することによって検出され、リンパ球の培養上清中に存在していることが知られている(57)。

近年、石坂ら(6)は、T リンパ球由来の IgE-BFs が、ラットモデルにおいて、アイソタイプ特異的に IgE 抗体産生調節に働くことを報告した。さらにレクチン・アフィニティクロマトグラフィーや糖タンパク質の糖鎖合成阻害剤を用いた研究により、IgE-BFs が同じタンパク質の糖鎖の違いによって、その生理的作用の異なる因子(増幅因子と抑制因子)になることを明らかにした。また、同グループの Huff ら(13)は、ラット T 細胞ハイブリド-マが産生する IgE-BFs (IgE 増幅因子と IgE 抑制因子)に対するポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体を作製し、rosette assay によりラット IgE 抑制因子、IgE増幅因子、そしてリンパ球上の FcεR に共通した抗原決定基が存在することを報告した。また、末村らは、ヒト T 細胞由来の IgE 特異的抑制因子が、FcεR に特異的な抗 RPMI8866 細胞抗体により吸収されることより、この因子とリンパ球膜上の FcεRには共通抗原性決定基が存在する可能性を示した(58)。Sarfati ら(59)は、Bリンパ球膜上のFcεRに特異的なモノクロナール抗体(Mab ER)がリンパ球のみならずマクロファージFcεR、さらにこれらの細胞由来の IgE-BFs を認識することを報告している。このことは、ヒト IgE-BFs が FcεRの構造と類似していることを示唆している。

そこで、本研究においては、ヒト B リンパ球 FcεR と同細胞上清から精製した IgE-BFsを用いて、免疫化学的および生化学的手法により、両者の構造類似性について検討した。

[実験材料および方法]

試薬

cycloheximide および trypsin-agarose は、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から入手した。また、papain-agarose は、Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) のものを使用した。

RPMI8866 細胞からの $Fc\epsilon R$ の調製

trypsin 処理に用いた $Fc\epsilon R$ の精製については、まず、RPMI8866 細胞 (約 1×10^6 細胞) を洗浄し、lysis buffer で可溶化し (第 1 章参照)、その遠心上清を Mab ER-immunosorbent と 4°C で一晩インキュベートした。このカラムを 0.5% NP-40 を含む PBS で十分洗浄後、0.5% NP-40 を含む 0.2 M glycine-HCl buffer (pH 2.3) で溶出し、この溶出液を直ちに 2 M Tris で中和後、0.5% NP-40 を含む PBS に対して透析した。この透析液は Centricon-10 (分子量 cut point 10KD; Amicon Co. MA) を用いて約 10 倍に濃縮し、精製した $Fc\epsilon R$ を得た。これに chloramine T 法にて放射性ヨウ素 (^{125}I) を標識した。

一方、 α -chymotrypsin および papain 処理に用いた $Fc\epsilon R$ は、最初に RPMI8866 細胞を lactoperoxidase 法によって細胞表面を放射性ヨウ素 (^{125}I) で標識した後、上記と同様に精製して用いた。これらの $Fc\epsilon R$ の純度は SDS-PAGE および autoradiography によって検定し、その分子量が 45KD と 37KD のバンドであることを確認してから、以下の実験に用いた。

RPMI8866 細胞の無血清培養液上清からの IgE-BFs の精製

IgE-BFs の精製は、次のように行った。すなわち、10% FCS を含んだ RPMI1640 培養液中で、RPMI8866 細胞を 5×10^5 cell/ml の細胞濃度で培養して、 5×10^9 の細胞を得た。この細胞を HBSS で洗浄後、FCS を含まない RPMI 1640 培養液に 5×10^6 cell/ml の割合に浮遊させ、一晚 37°C でインキュベートした。その細胞培養上清を遠心操作で分離し、 NaN_3 (最終濃度 0.02%, 以下同様), ϵ -ACA (5 mM), EDTA(1.7 mM)を加えた。これを $0.2\mu\text{m}$ の Millipore filter で濾過した後、YM 5 membrome (分子量 cut point 5KD) と Amicon ultrafiltration unit で約 100 倍に濃縮した。この濃縮RPMI8866 細胞上清を流速 2 ml/hr で Mab ER (30) - Affi Gel (約 1.5 ml) カラムを通し、20 ゲル容量の 0.5 M NaCl および 0.05% Triton X-100 を含んだ PBS、続いて 40 ゲル容量の PBS で洗浄後、0.1 M glycine-HCl buffer (pH 2.6)で溶出した。溶出液に 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0) と 2 % (v/v) の Tween 20 を加え、さらに 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)に対して透析した。この透析液は同じ buffer で平衡化した TSK 545 DEAEカラム (LKB, Bromma, Sweden) を用いて、NaCl 濃度を 0 から 1 M までの直線的濃度勾配で、流速 1 ml/min で溶出した (LKB HPLC system を使用)。各分画中の IgE-BFs を radioimmunoassay により測定し、活性画分を Centricon-10 を用いて約 10倍に濃縮した後、chloramine T 法にて放射性ヨウ素を標識した。標識した IgE-BFs の分子量は SDS-PAGE で検討した。

Fc ϵ R 陽性細胞の検出

細胞膜上の Fc ϵ R は、Mab ER を CrCl_3 を用いてコートしたウシ赤血球による rosetteassay により検討した(60)。すなわち、ウシ赤血球に等容量の CrCl_3 (1 mg/ml)と Mab ER (1mg/ml)を室温で 9 分間反応させ、生理食塩水で洗浄後、3% ウシ血清アルブミンを含むHBSS に、2% (v/v) の濃度に浮遊させた。この Mab ER をコートした赤血球 (以下 Mab ER-E

と略す)と、FcεR 陽性細胞である RPMI8866 細胞を用いてその結合を確認した後、下記の assay に用いた。rosette assay は次の様に行った。まず 50 μl の Mab ER-E に、50 μl の細胞 (2×10^6 cells/ml) を浮遊させ、氷中で 10 分間インキュベートした後、200 x g, 4°C で遠心した。さらに、その遠心した試験管を氷中で 4 時間放置し、10 μl の 0.02% acridine orange と 100 μl の 3% ウシ血清アルブミンを含む HBSS を加えて、ゆるやかに浮遊させ、蛍光顕微鏡を用いて観察した。rosette 形成細胞の比率は、500 個の蛍光陽性細胞中 3 個以上の Mab ER-E が細胞に付着している細胞から求めた。

IgE-BFs を検出するための radioimmunoassay

細胞培養上清中の IgE-BFs の検出には、Sarfati らによって報告されている solid phase の radioimmunoassay (RIA) を用いて測定した (59)。すなわち、96 穴の polyvinyl microtiter plate (Fisher Scientific Co. Fairlawn, NJ) に 100 μl の Mab ER 176 (15 μg/ml) を一晩インキュベートしてコートし、非特異的吸着部位を 10% FCS を含んだ HBSS でブロックした。100 μl の試料を各穴に加え 4 時間反応させ、洗浄後、100 μl の ^{125}I 標識 Mab ER 135 (3.5×10^5 cpm/ml) を加え、さらに一晩反応させた。反応後、洗浄して、各穴の放射活性を gamma counter (Beckman) にて測定した。ブランクには、10% FCS を含んだ HBSS を用いた。

Peptide mapping

α-chymotrypsin 処理は、0.5% NP-40 を含む 0.125 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) で調製した 30 μl の放射性標識試料 (約 2×10^4 cpm) に 1.5 μl の α-chymotrypsin (4 mg/ml) を加え、37°C で 30 分間インキュベートして行った。処理した試料については、2 次元電気泳動法と autoradiography により検討した。

trypsin 分解は、PBS (pH 8.0) に透析した放射性ヨウ素標識試料 (約

2×10^4 cpm) に trypsin-agarose (5 units) を加え、 37°C で一晩インキュベートして行った。分解したペプチドを遠心操作で分離し、その上清を HPLC で分画した。すなわち、trypsin 分解したペプチドを、Hi-Pore RP-304 逆相カラム (Bio-Rad, Richmond, CA) と LKB HPLC system を用いて、流速 1 ml/min で、 0.1% trifluoroacetate (TFA) を含む 5% acetonitrile から 0.1% TFA を含む 75% acetonitrile の 120 分間直線的濃度勾配で溶出した。溶出液は 0.5 分ごとに分画して、それらの放射活性を gamma counter で測定した。

一方、papain 分解は、 10 mM EDTA 2 Na , 20 mM NaH_2PO_4 を含む 20 mM cystein-HCl buffer ($\text{pH } 6.2$) に調製した放射標識試料 (約 3×10^4 cpm) に $250 \mu\text{l}$ の papain-agarose を加え、 37°C で 16 時間反応させた。反応後、遠心操作で agarose を除去し、その分解したペプチドを SDS-PAGE で検討した。

[結 果]

Fc ϵ R と IgE-BFs の抗原性の検討

RPMI8866 細胞の Fc ϵ R と同細胞由来の IgE-BFs の共通抗原性を調べるために、放射性ヨウ素標識 RPMI8866 細胞の NP-40 可溶化上清と精製した IgE-BFs をそれぞれ 7 種類の Mab ER で免疫沈降させた。沈降した Fc ϵ R または IgE-BFs は 2-ME 存在下の SDS-PAGE および autoradiography によって検出した。すべての Mab ER は Fc ϵ R の $65\text{-}95\text{KD}$, 45KD , 37KD の 3 成分 (Fig. 13 Left) および分子量 $25\text{-}27\text{KD}$ の IgE-BFs (Right) と反応した。しかし、コントロール Mab とは反応しなかった (lane A)。

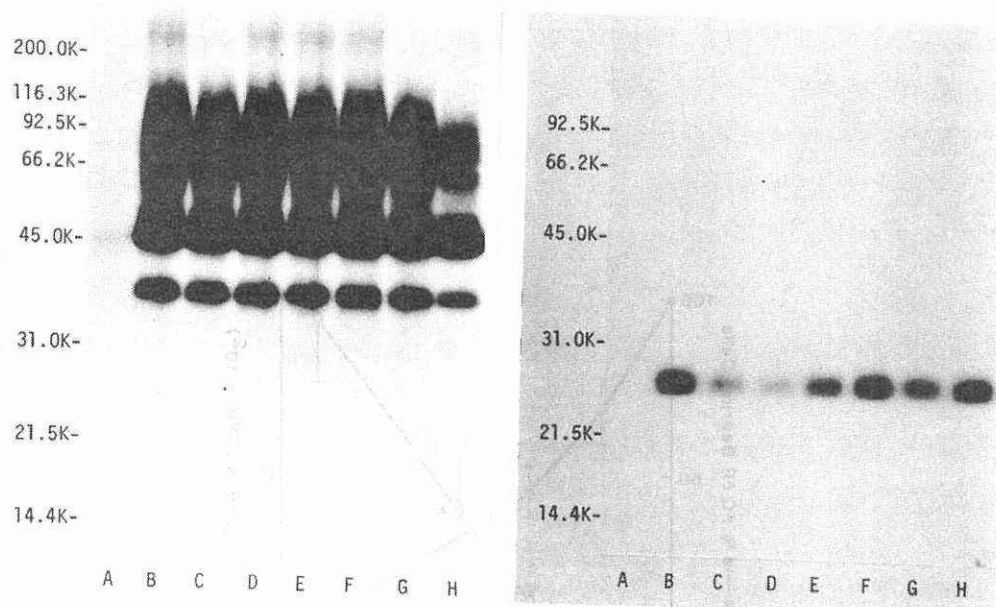


Figure 13.

Immunoprecipitation of radiolabeled IgE-BFs (Right) and FcεR (Left) by 8 kinds of Mab ER, lanes A to H correspond to unrelated Mab and to Mab ER 64, 45, 3/79, 2/79, 135, 30 and 14, respectively.

細胞膜 FcεR からの IgE-BFs の放出の検討

リンパ球を 37°C で培養することによって、細胞膜上の FcεR が消失することが Delespesse らによって報告されている (60)。そこで、細胞膜上の FcεR の消失と培養上清中への IgE-BFs の出現の関係を経時的に検討した。すなわち、(FcεR 陽性細胞源として)ヒト扁桃細胞を FCS を含まない RPMI1640 培養液に 3×10^6 cell/ml の割合で浮遊させ

37°C で CO₂ incubator で培養し、2, 4, 6, 24 時間目に培養液をハーベストした。これらの細胞については、洗浄後、Mab ER-E を用いた

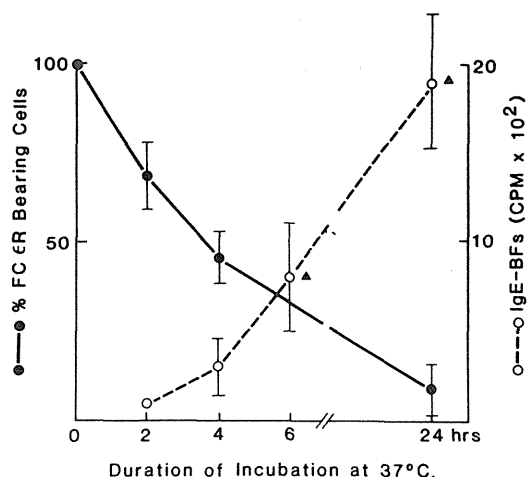


Figure 14.

Kinetic analysis of the disappearance of FcεR from the surface of tonsillar lymphocytes and of the release of IgE-BFs in the culture supernatant. FcεR bearing cells were determined by rosetting with Mab ER-coated erythrocytes, and the proportion of positive cells is expressed in percent of the value determinant of freshly isolated cells. IgE-BFs was measured by RIA, and the results are expressed in net cpm after subtraction of the background. The data are the mean values of experiments performed in duplicate. Plain triangles show the values of IgE-BFs proportion obtained in culture containing cycloheximide.

rosette assayで、細胞膜上のFcεRを調べた。一方、培養上清については、10 倍に濃縮して IgE-BFs を RIA で測定した。

結果は、Fig. 14 に示すように、細胞膜上の FcεR が経時的に消失するのに反し、培養液中へのIgE-BFsの出現は逆に増加することが認められた。さらに、タンパク質合成阻害剤であるcycloheximide(10 μg/ml)の存在下でも、同様の結果であった。

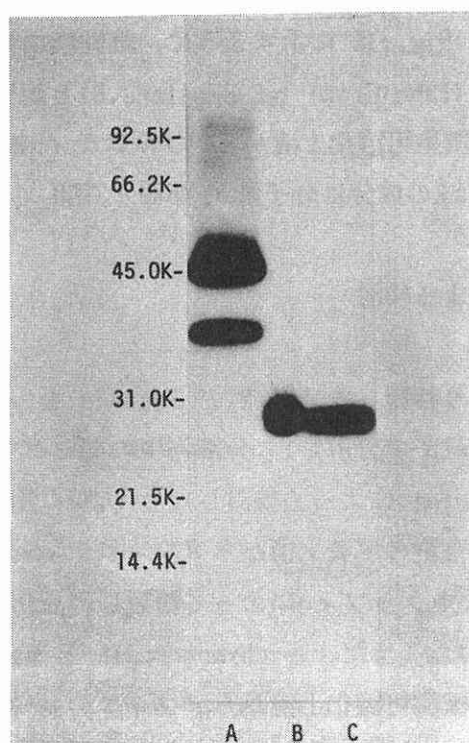


Figure 15.

SDS-PAGE analysis of the labeled material released by surface radioiodinated RPMI 8866 cells. lane A : immunoprecipitate of NP-40 cell lysate, lane B: material isolated from the culture supernatant of labeled RPMI8866 cells by affinity chromatography on Mab ER-Affi-Gel, lane C: purified IgE-BFs.

次に、放射性ヨウ素で細胞標識した RPMI8866 細胞から培養液中に放出される可溶性成分について検討した。すなわち、細胞表面を lactoperoxidase 法で標識した細胞 (3×10^6 cell/ml) を無血清培養液中で、37°C で 27 時間インキュベートした。この細胞と培養上清を遠心操作で分離し、細胞を lysis buffer で可溶化した。これらの細胞可溶化上清と細胞培養上清を、それぞれの Mab ER-immunosorbent で吸収し、その glycine-HCl buffer 溶出液を SDS-PAGE および autoradiography で検討した。この時、別に RPMI8866 細胞の非標識培養上清から精製、標識した IgE-BFs も泳動した。結果は Fig. 15 に示すように、細胞膜由来の Mab ER に反応する可溶性の成分 (lane C) が IgE-BFs (lane B) と同じ分子量の 25-26 KD であった。一方、細胞可溶化上清からアフィニティ-精製した (glycine-HCl buffer 溶出) FcεR の成分は分子量が 45KD と 37KD であった (lane A)。

Peptide mapping による検討

RPMI 8866 細胞より精製した FcεR と IgE-BFs を α-chymotrypsin, trypsin および papain で分解し、分解物中の同一ペプチドの存在について peptide mapping によって検討した。実験に用いた IgE-BFs については、RPMI8866 細胞の培養上清からアフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、chloramine T 法で放射性ヨウ素を標識した。また、α-chymotrypsin と papain 処理に用いた FcεR は細胞膜標識可溶化上清からアフィニティ-精製したものを使用した。また Trypsin 分解に用いた FcεR は細胞可溶化上清からアフィニティ-精製した後、chloramine T 法で標識したものをを用いた。α-chymotrypsin で分解した FcεR と IgE-BFs の検出は、2次元電気泳動法で泳動し autoradiography で行った。その結果、FcεR (Fig. 16a) は、25-26KD のポリペプチド (b) に分解されたことが判明した。一方、IgE-BFs (c) は、この条件下ではほとんど分解されなかった (d)。分解した FcεR のポリペプチドの分子量とその等電点 (pI) は IgE-BFs のそれとほぼ同一であった。

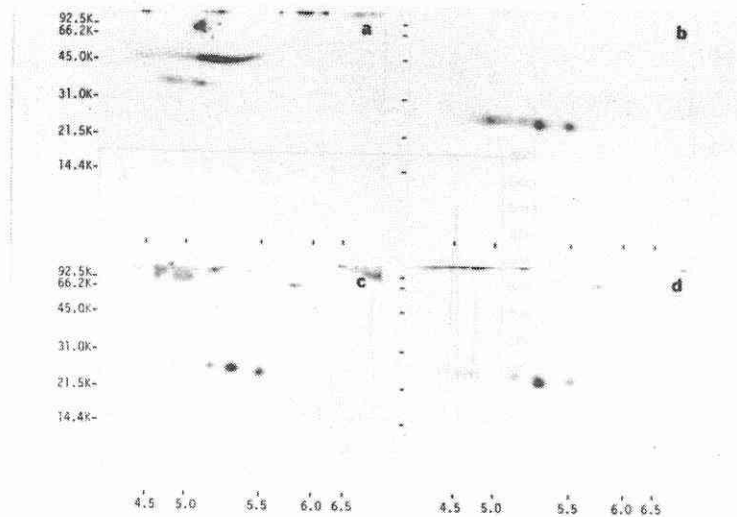


Figure 16.

α -chymotrypsin digestion of $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ and IgE-BFs. Two dimensional electrophoretic analysis of $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ before (panel a) and after α -chymotrypsin digestion (panel b), and of IgE-BFs before (panel c) and after α -chymotrypsin digestion (panel d).

trypsin 分解は、 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ および IgE-BFs を trypsin-agarose を用いて、 37°C で一晩処理して行った。この trypsin 分解物を HPLC を用いて逆相

クロマトグラフィーで分画し、0.5 分ごとに分取し放射活性を測定した。Fig. 17 に示すように、分解した FcεR(A) と IgE-BFs(B)のペプチドのうち少なくとも3つのピーク(Fr. 8, 14, 39)が同じ分画に溶出された。これは、これらのペプチドが同じ疎水性であることを示している。

papain 分解は、papain-agarose を用いて、FcεR および IgE-BFs

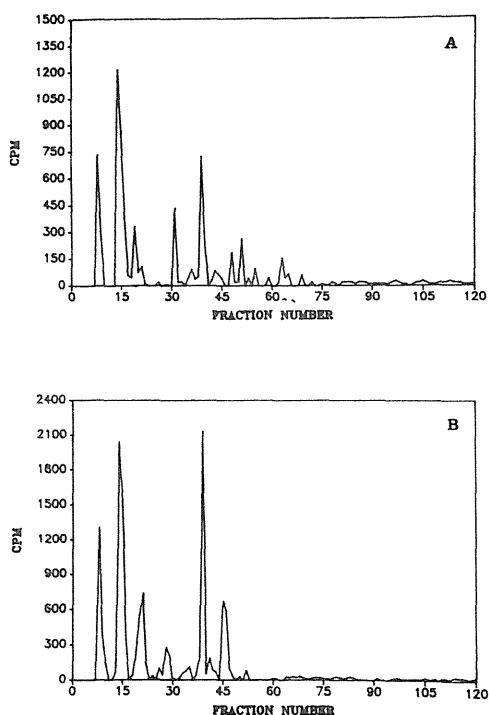


Figure 17.

Tryptic peptide analysis of FcεR (panel A) and IgE-BFs (panel B). The tryptic peptides were separated by reverse-phase chromatography on Hi-Pore RP-304 column by using a linear gradient of 5 to 75% acetonitrile in 0.01% TFA.

を 37°C で反応させることにより行った。分解したペプチドの一部をそのまま、残りを Mab ER で免疫沈降させた後、SDS-PAGE によって検討した。この酵素処理で、FcεR と IgE-BFs は分子量15KD のペプチドに分解され (Fig. 18 A, D)、しかもそれらは Mab ER によって免疫沈降した (B, E)。しかし、コントロール Mab とは反応しなかった (C, F)。

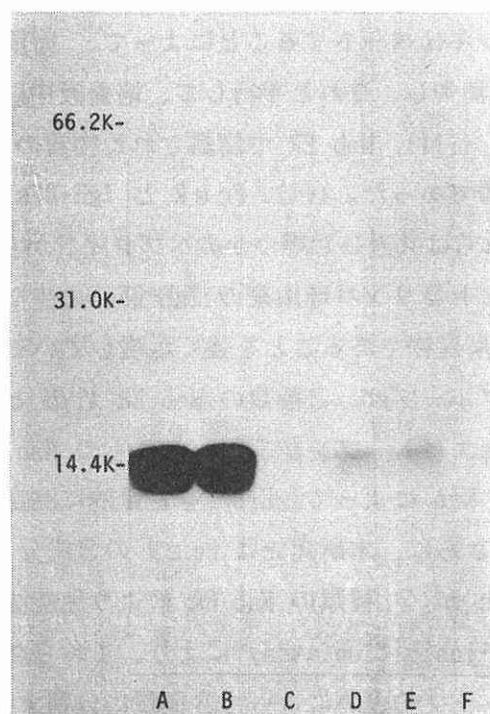


Figure 18.

Autoradiography of SDS-PAGE of papain digested FcεR and IgE-BFs. Lanes A and D; digested FcεR and IgE-BFs. Lanes B and E; precipitated by Mab ER 30 of digested FcεR and IgE-BFs. Lanes C and F; precipitated by unrelated Mab of digested FcεR and IgE-BFs.

[考 察]

本研究において、ヒトBリンパ球細胞膜上の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と同細胞由来の IgE-BFs の構造類似性を免疫化学的および化学的に検討した。その結果、(i). $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と IgE-BFs には同じ抗原決定基が存在し、それは、7種の Mab ER で確認された。(ii). $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ を持つヒト扁桃細胞を 37°C で無血清培養液中でインキュベートすることによって、時間経過とともに細胞膜上の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ が消失し、それと平行して、培養液中に同じ抗原性を持つ成分が出現した。(iii). Mab ER で認識された物質の分子量が、IgE-BFs と同一の 25-26KDであった。(vi). $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と IgE-BFs の peptide mapping により、これらは共通した幾つかのペプチドから構成されていた。以上の結果は、ヒトBリンパ球由来の IgE-BFs の少なくとも一部は細胞上の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の分解産物であることを強く示唆している。

近年、我々のグループは、2種類の Mab ER (176 と 135) が IgE-BFs 分子上の異なったエピトープを認識し、これらの Mab ER を用いた sandwich solidphase RIA によってIgE-BFsを定量的に測定できることを明らかにした(59)。さらに、本研究では $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の3成分 (65-95KD, 45KD, 37KD) と IgE-BFs が 7 種類の Mab ER により免疫沈降することを示した。また、cross-inhibition assay により、これらの Mab ER をそれらの認識するエピトープの違いによって3種類に分類することができた(未発表)。このことは、 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と IgE-BFs とが分子上に少なくとも 3種類の異なった抗原決定基を共有していることを示している。興味あることに、Mab ER "176" と "135" が認識する抗原決定基は、ヒトリンパ球の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と IgE-BFs のみならず、単球の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と IgE-BFs にも認められた。Huff ら(13)は、ラットを用いた実験系でのTリンパ球由来の IgE-BFs に対するモノクローナルとポリクローナルの抗体を作製し、これらの抗体がBリンパ球膜上の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と交叉反応することを報告した。これらラットのT細胞由来の IgE-BFs の知見と本実験の成果はよく一致した。さらに、3 種類の特異性の異なるタンパク質分解酵素による $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ と

IgE-BFs の peptide mapping によって、両者に幾つかの共通したペプチドが認められた。このことは FcεR と IgE-BFs の分子中に同じアミノ酸配列を持ったペプチドの存在を示している。さらに、α-chymotrypsin 処理した FcεR が分子量 25-27 KD, pI 4.7-5.5 の約4種類のペプチドに分解され (Fig. 16 参照)、それが無処理の IgE-BFs、または酵素処理した IgE-BFs とほとんど識別できないことより、この実験条件下で α-chymotrypsin が FcεR の IgE-BFs に相当する部分との境目か、あるいはそれに非常に接近した部位に作用していることを示唆している。また興味あることに、papain で分解した FcεR と IgE-BFs は同じ分子量 (15KD) のペプチドが検出され、さらにそれらは Mab ER によっても免疫沈降した。これは分子量のみならず、ペプチドの共通抗原性からも、同一物質であることを強く示唆している。以上の結果より FcεR と IgE-BFs が一本鎖のタンパク質で、これらが同じ遺伝子にコードされている可能性が強く示唆された。この考察は我々のグループの最新の実験結果によって確認された (50)。すなわち、RPMI8866 細胞から FcεR の遺伝子をクローニングし、その cDNA を COS 細胞を用いて発現させたところ、細胞膜上に IgE に結合能を持つ FcεR が発現され、かつ IgE-BFs の産生が認められた。この IgE-BFs が細胞膜上の FcεR の分解産物として産生されるのか、または、この因子の一部が膜ドメインなしに直接分泌されるかは、興味のある問題点である。後者の場合、次の2つの可能性が考えられる。i) レセプター分子をコードしている mRNA の一部がこの因子をコードしているサブユニットに splice する。ii) レセプターとこの因子が一つの同じ前駆体タンパク質が合成され、それが細胞内で分泌型のタンパク質に分かれる。現在、FcεR の cDNA による検討が可能であるが、本研究でも細胞表面を標識した RPMI8866 細胞の培養上清中に分子量 25-26 KD の標識された分子が出現し、分子量 45KD の FcεR は検出されなかった。これは、少なくとも IgE-BFs が細胞膜上の FcεR 由来であることを証明している。ヒト扁桃細胞表面の FcεR の消失と平行して培養上清中への IgE-BFs の出現が観察されたが、同様な知見が、既に Delespesse らによって報告されている (60)。すなわち、ヒ

ト末梢血リンパ球を 37°Cで一晩インキュベートするとほとんどの細胞膜上の FcεRが消失した。さらに、その現象は IgE によって阻害された。本研究では、Bリンパ球源としてヒト扁桃腺細胞とヒトBリンパ球細胞株であるRPMI8866細胞を用いたが、後者の細胞は、37°C のインキュベートでも、絶えず FcεR を表現していた。これは、形質変化した細胞の FcεR の回転率が形質変化していない細胞より速いためだと思われるが、その詳細についてはまだ不明である。

近年、Martens ら(61)は、ラットTリンパ球細胞由来の IgE-BFs をコードした cDNAをクローニングし、その遺伝子が細胞膜透過ドメインを持たない分子量 60KD のタンパク質であることを報告した。このモデルによると、Tリンパ球由来のIgE-BFsは細胞膜FcεRの分解産物ではなく、分泌型のタンパク質であった。また、この IgE-BFs とヒト FcεR の cDNA 配列を比較したところ、両者間に相同性は認められなかった。

本研究がヒトBリンパ球を用いているのに対して、彼らはラットTリンパ球を使用している。これについて考察すると、Bリンパ球およびTリンパ球由来の IgE-BFs はそれぞれ異なった遺伝子産物であるものと思われるが、いずれも IgE 結合能を有するリンホカインを産生するという点で興味深い。また本研究に用いた Mab ER がマクロファージのFcεR およびその IgE-BFs をも認識すること(59)により、それらの FcεR と IgE-BFs がBリンパ球由来の IgE-BFs と同一であるか、または非常に類似した構造をもっている可能性を強く示唆する。

本研究によって、Bリンパ球由来の IgE-BFs が細胞膜上の FcεR の分解産物であることは、この因子の産生に細胞自身のタンパク質分解酵素が関与している可能性が強く示唆された。しかし、IgE 抗体産生の調節に関与する FcεR および IgE-BFs の解析には、さらに詳細な研究が必要であると思われる。

[総 括]

IgE 抗体の Fc 部分に対するレセプター($\text{Fc}\epsilon\text{R}$)には、そのアフィニティーおよび抗原性の相違によって、2種類に分類されることが知られている。肥満細胞や好塩基球上に存在するアフィニティーの高い $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ については、その構造や生理学的意義に関して多数の報告がなされている。これに対して、Bリンパ球、Tリンパ球、単球およびマクロファージ上のアフィニティーの低い $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の構造や生理学的活性についての報告は少ない。

本研究では、我々のグループで作製したヒトBリンパ球上の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ に特異的に反応するマウスモノクローナル抗体(Mab ER)を用いて、ヒトBリンパ球(RPMI8866 細胞)上の $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の構造と同細胞由来の IgE 結合因子(IgE-BFs)との構造類似性について、免疫化学的および生化学的に追究し、下記に要約した新しい知見を得た。

(1) 固相の IgE に結合する $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ は、Mab ER が認識した抗原と同一であった。また、IgE と比較して Mab ER を用いた場合は高い結合性と良い再現性が認められた。

(2) この Mab ER が認識した $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ 成分は、還元状態下での SDS-PAGE で分子量 65-95KD, 45KD, 37KD であり、非還元下では 45KD と 37KD の成分がそれぞれ 43KD と 31KDにシフトした。また、それらの等電点は 65-95KD 成分が pI 4.2-4.4、45KD と 37KD 成分が pI 5.1-5.2 であった。

(3) Western blot 法により $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ 3成分の抗原性を Mab ER で検討したところ、65-95KD と 43KD の成分に共に共通した抗原決定基が存在することが認められた。しかし、還元下の SDS-PAGE では、いずれの成分も Mab ER とは反応しなかった。

(4) N-Glycanase および tunicamycin を用いた実験から、 $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ の 65-95KD と 45KDの成分に N-結合型糖鎖の存在が示され、また、65-95KD

成分は N-Glycanase に耐性の糖鎖であることが示唆された。

(5) α -chymotrypsin による peptide mapping により、Fc ϵ R の3成分は幾つかの共通したペプチドで構成されていることが示された。

(6) Fc ϵ R と IgE-BFs には、7 種類の Mab ER で認識される共通抗原基が存在した。

(7) ヒト扁桃細胞を37°Cでインキュベートすると、時間経過とともに細胞膜上の Fc ϵ Rが消失し、培養液中にはそれと平行して IgE-BFs の出現が認められた。また、Bリンパ球(RPMI8866 細胞)の培養上清中に Mab ER で認識される細胞膜由来の成分が検出され、その分子量は IgE-BFs と同一であった。

(8) α -chymotrypsin, trypsin および papain による peptide mapping により、Fc ϵ R と IgE-BFs が幾つかの共通したペプチドで構成されていることが示された。さらに、papain 分解で得られた Fc ϵ R と IgE-BFs のペプチド(15KD)には、共に Mab ERと反応する抗原決定基が存在した。

以上の成績から、この Mab ER で認識されたヒトBリンパ球上のFc ϵ R は、65-95KD, 45KD および 37KD の3成分で構成されていることが示された。このうち、65-95KD と 45KD の成分はともに N-結合型糖鎖をもったタンパク質であり、これら両成分には共通した抗原決定基が存在した。しかし、65-95KD 成分は 45KD 成分のダイマーではなく、他の成分と結合した複合体である可能性が示唆された。また、37KD の分子は 45KD 成分の分解産物であると考えられた。一方、Bリンパ球膜上の Fc ϵ R と同細胞由来の IgE-BFs には共通抗原決定基が存在し、また、共通したペプチドで構成され、さらに、細胞膜由来のMab ER で認識される抗原が培養上清に存在したことより、この IgE-BFs の少なくともその一部は細胞膜上の Fc ϵ R 由来の分解産物であることが示された。さらに、Fc ϵ R の3成分と IgE-BFs が同一の遺伝子上にコードされている可能性が強く示唆された。

[謝 辞]

本研究に際し、終始御指導および御鞭撻を賜わった Montreal 大学医学部、Guy Delespesse 教授に深く感謝の意を表します。また本論文の作成に関して有意義な御助言を賜りました城西大学薬学部 久恒 和仁教授、倉田 宗司 教授、谷 寛 助教授、北里大学 衛生学部 合田 朗 教授 ならびに 国立相模原病院アレルギー-臨床研究部 室長 柳原行義 博士に深謝致します。さらに、この研究に御協力頂いた Manitoba 大学医学部免疫学教室、および Montreal 大学医学部 Notre-Dame 病院研究センターの皆様には感謝致します。

[文 献]

- 1) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M. M. J. Immunol., 97, 840 (1966).
- 2) Ishizaka, T. and Ishizaka, K. Prog. Allergy, 19, 61 (1975).
- 3) Katz, D. H., Hamaoka, T. and Benacerraf, B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2776 (1973).
- 4) Takatsu, K. and Ishizaka, K. J. Immunol., 116, 1257 (1976).
- 5) Okudaira, H. and Ishizaka, K. Cell Immunol., 58, 188 (1981).
- 6) Ishizaka, K. Annu. Rev. Immunol., 2, 159 (1984).
- 7) Huff, T. F., Uede, T. and Ishizaka, K. J. Immunol., 129, 509 (1982).
- 8) Metzger, H., Alcaraz, G., Hohman, R., Kinet, J., Pribluda, V. and Quarto, R. Annu. Rev. Immunol., 4, 419 (1986).
- 9) Spiegelberg, H. L. Adv. Immunol., 35, 61 (1984).
- 10) Capron, M., Bazin, H., Joseph, M. and Capron, A. J. Immunol., 126, 1764 (1981).
- 11) Nagai, T., Adachi, M., Noro, N., Yodoi, J. and Uchino, H. Clin. Immunol. Immunopathol., 35, 261 (1985).
- 12) Yodoi, J. and Ishizaka, K. J. Immunol., 122, 2577 (1979).
- 13) Huff, T. F., Yodoi, J., Uede, T. and Ishizaka, K. J. Immunol., 132, 406 (1984).
- 14) Meinke, G. C., Magro, A. M., Lawrence, D. A. and

- Spiegelberg, H. L. J. Immunol., 121, 1321 (1978).
- 15) Finbloom, D. S. and Metzger, H. J. Immunol., 130, 1489 (1983).
- 16) Conrad, D. H. and Peterson, L. H. J. Immunol., 132, 796 (1984).
- 17) Lee, W. T. and Conrad, D. H. J. Immunol., 134, 518 (1985).
- 18) Köhler, G. and Milstein, C. Nature, 256, 495 (1975).
- 19) McMichael, A. J. and Milstein, C., eds. Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. Academic Press, London (1982).
- 20) Rector, E., Nakajima, T., Rocha, C., Duncan, D., Lestourgeon, D., Mitchell, R. S., Fischer, J., Sehon, A. H. and Delespesse, G. Immunology, 55, 481 (1985).
- 21) Bennich, H. and Johansson, S. G. O. Adv. Immunol., 13, 1 (1971).
- 22) Kanellopoulous, J., Liu, T. Y., Poy, G. and Metzger, H. J. Biol. Chem., 255, 9060 (1980).
- 23) Gonzalez-Molina, A. and Spiegelberg, H. L. J. Clin. Invest., 59, 616 (1977).
- 24) Friche, R. and Spiegelberg, H. L. J. Immunol., 121, 471 (1978).
- 25) Melewicz, F. M. and Spiegelberg, H. L. J. Immunol., 125, 1026 (1980).
- 26) Melewicz, F. M., Plummer, J. L. and Spiegelberg, H. L. J.

- Immunol., 129, 563 (1982).
- 27) Capron, A., Dessaint, J. P. and Capron, M. Nature, 253, 474 (1975).
- 28) Capron, M., Capron, A., Dessaint, J. P., Torpier, G., Johansson, S. G. O. and Prin, L. J. Immunol., 126, 2087 (1981).
- 29) Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H. and Viens, P. Nature, 303, 810 (1983).
- 30) Capron, M., Spiegelberg, H. L., Prin, L., Bennich, H., Butterworth, A. E., Pierce, R. J., Allouaissi, M. and Capron, A. J. J. Immunol., 132, 462 (1984).
- 31) Rankin, J. A., Hitchcock, M., Merrill, W., Back, M. K., Brashler, J. R. and Ashkenase, P. W. Nature, 297, 329 (1982).
- 32) Rouzer, C. A., Scott, W. A., Hamill, A. L., Liu, F. -T., Katz, D. H. and Cohn, Z. A. J. Exp. Med., 156, 1077 (1982).
- 33) Spiegelberg, H. L., O'Connor, R. D., Simon, R. A. and Mathison, D. A. J. Clin. Invest., 64, 714 (1974).
- 34) Yodoi, J., Ishizaka, T. and Ishizaka, K. J. Immunol., 123, 455 (1979).
- 35) Sarfati, M., Rector, E., Wong, K., Rubio-Trujillo, M., Sehon, A. H. and Delespesse, G. Immunology, 53, 197 (1984).
- 36) Sarfati, M., Rector, E., Rubio-Trujillo, M., Wong, K., Sehon, A. H. and Delespesse, G. Immunology, 53, 207 (1984).

- 37) Conrad, D. H. and Froese, A. J. Immunol., 116, 319 (1976).
- 38) Laemmli, U. K. Nature, 227, 680 (1970).
- 39) Staros, J. V. Biochemistry, 21, 3950 (1982).
- 40) O'Farrell, P. H. J. Biol. Chem., 250, 4007 (1975).
- 41) Plummer, T. H. Jr., Elder, J. H., Alexander, S., Phelan, A. W. and Tarentino, A. L. J. Biol. Chem., 259, 10700 (1984).
- 42) Elder, J. H. and Alexander, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4540 (1982).
- 43) Cleveland, D. W. Meth. Enzy., 96, 222 (1983).
- 44) Peterson, L. H. and Conrad, D. H. J. Immunol., 135, 2654 (1985).
- 45) Yip, C. C., Yeung, C. T. W. and Moule, M. L. Biochemistry, 19, 70 (1980).
- 46) Wang, C. C., Hedo, J. A., Kahn, C. R., Saunders, D. T., Thamm, P. and Brandenburg, A. Diabetes, 31, 1068 (1982).
- 47) Struck, D. K. and Lennarz, W. J. J. Biol. Chem., 252, 1007 (1977).
- 48) Suemura, M., Kikutani, H., Barsumian, E. L., Hattori, Y., Kishimoto, S., Sato, R., Maeda, A., Nakamura, H., Owaki, H., Hardy, R. R. and Kishimoto, T. J. Immunol., 137, 1214 (1986).
- 49) Noro, N., Yoshioka, A., Adachi, M., Yasuda, K., Masuda, T. and Yodoi, J. J. Immunol., 137, 1258 (1986).
- 50) Ludin, C., Hofstetter, H., Sarfati, M., Levy, C. A., Suter,

- U., Alaimo, D., Kilchherr, E., Frost, H. and Delespesse, G. EMBO J., 6, 109 (1987).
- 51) Mishina, M., Tobimatsu, T., Imoto, K., Tanabe, K., Fujita, Y., Fukuda, K., Kurasaki, M., Takahashi, H., Morimoto, Y., Hirose, T., Inayama, S., Takahashi, T., Kuno, M. and Numa, S. Nature, 313, 364 (1985).
- 52) Ullrich, A., Bell, J. R., Chen, E. Y., Herrera, R., Petruzzelli, L. M., Dull, T. J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y. C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P. H., Grunfeld, C., Rosen, O. M. and Ramachandran, J. Nature, 313, 756 (1985).
- 53) Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown, M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L. and Russell, D. W. Cell, 39, 27 (1984).
- 54) Schneider, C., Owen, M. J., Banville, D. and Williams, J. G., Nature, 311, 675 (1984).
- 55) Claesson, L., Larhammar, D., Rask, L. and Perterson, P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7395 (1985).
- 56) Suemura, M., Yodoi, J., Hirashima, M. and Ishizaka, K. J. Immunol., 125, 148 (1980).
- 57) Yodoi, J., Hirashima, M. and Ishizaka, K. J. Immunol., 125, 1436 (1980).
- 58) Suemura, M. and Kishimoto, T. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 77, 26 (1985).

- 59) Sarfati, M., Mutman, T., Fonteyn, C. and Delespesse, G.
Immunology, 59, 569 (1986).
- 60) Delespesse, G., Sarfati, M., Rubio-Trujillo, M. and Wolowiec,
T. Eur. J. Immunol., 16, 815 (1986).
- 61) Martens, C., Huff, T. F., Jardieu, P., Trounstein, M. T.,
Coffman, R. C., Ishizaka, K. and Moore, K. W. Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, 82, 2460 (1985).

